

Коррекция искажений, вносимых средой зазора «игла – биологическая поверхность» зондового микроскопа

Аннотация

Рассматривается создание алгоритма компенсации искажающего действия слоя среды, заполняющей зазор «игла – биоповерхность», в технике исследования зондовой и атомно-силовой микроскопии (AFM). Предлагаемый нами алгоритм коррекции сигнала изображения основан на процедуре апостериорной обработки данных измерения и базовых положениях теории фильтрации и цифровой обработки изображений. Для созданной модели мы рассчитали среднеквадратическую ошибку восстановления, малое значение которой указывает на эффективность предложенного алгоритма улучшения качества изображения поверхности молекулярных биообъектов.

Введение

Использование в медицине и биологии систем зондовой микроскопии предоставляет новые возможности изучения свойств биоматериалов, их наноразмерной структуры, молекулярной поверхности [1]-[3]. Именно наличие атомно-силовых микроскопов (англ. atomic-force microscope, AFM) и других модификаций сканирующих систем зондовой микроскопии позволяет вести интенсивные исследования молекулярного и атомного размеров природных и искусственных покрытий биологических объектов в последние годы [4]-[8].

Зондовая микроскопия является мощным информационным источником наблюдения структур молекулярного и атомного размеров. В ней, наряду с визуализацией изображения исследуемой поверхности биообъекта, извлекается необходимая информация об объекте, используемая затем для управления его параметрами [9]-[11]. Восстановление изображения молекулярных и атомного размеров биологических поверхностей невозможно [12] без качественного преобразования наблюдаемой структуры в сигнал. Качество преобразования изображения зависит от условий, метода наблюдения и других возможностей [12]-[15] зондовой системы изучения биологического объекта.

В плане повышения качества изображения особый интерес представляет коррекция влияния искажений сигнала при бесконтактном 3D-сканировании биообъекта в цепи передачи сигнала [2]-[6], [12] в условиях рассеивающей среды, заполняющей зазор «игла – поверхность». В [2]-[4], [12], [13] уделено внимание решению этой задачи, способам устранения артефактов при 3D-сканировании и восстановлению искаженного изображения, в том числе рассеивающей средой [2], [8]. В частности, в работе [2] в предположении линейного влияния рассеивающей среды проведен анализ точности восстановления изображения в зависимости от типа объекта и свойств среды. Исследование показало, что учет влияния среды позволяет существенно улучшить качество изображения по сравнению с традиционными методами реконструкции.

Принцип измерения параметров поверхности объектов исследования молекулярного и атомного размеров, реализованный в AFM и других средствах сканирующей микроскопии, является поистине уникальным. Он основан на измерении степени потери устойчивости состояния равновесия иглой зонда под действием вынуждающей силы с фундаментально ограниченной точностью. Пространственное разрешение и точность измерения структуры поверхности в AFM в большой степени определяет геометрия игл, точнее, их острота [1]-[3]. Достижения наноразмерной углеродной технологии позволили улучшить показатели качества зондовой микроскопии: получить пространственное разрешение менее нанометра [6]. По данным [10], пока в единичных случаях, предельное пространственное разрешение систем зондовой микроскопии и AFM доведено до единиц ангстрема: 4 и 1,2 Å. В [1], [11] показано, что зонды обладают разрешением: 2...6 нм в плоскости поверхности и до

2 Å по вертикальной оси к ней. Эти показатели разрешения многократно достижимы и не являются исключением в обычной практике зондовой микроскопии.

В процессе обработки изображений, получаемых в зондовой микроскопии поверхности природных и искусственно создаваемых биообъектов, стремятся достичь предельно возможной точности измерения [9]. Одним из факторов, мешающих повысить точность измерения, является искажающее действие среды, заполняющей зазор «игла – биоповерхность» в зондовой системе.

Рассмотрим особенности проведения измерений молекулярных структур сканирующими микроскопами. Во-первых, зондовые микроскопы в настоящее время – один из лучших инструментов проникновения в свойства структуры элементов молекулярного и атомного мира веществ – считаются уникальными объектами. Данные измерений, получаемые посредством систем зондовой и атомно-силовой микроскопии, также часто являются уникальными.

Во-вторых, ввиду уникальности, сингулярности и случайности параметров и свойств поверхности объекта исследования, получаемые данные не обладают достаточной статистической, которая позволила бы их обобщить на соответствие той или иной статистической закономерности.

В-третьих, разделяющий иглу зонда и поверхность наблюдения тонкий слой среды в зазоре «игла – поверхность» является неизбежным элементом цепи формирования сигнала изображения AFM.

В итоге уникальность и сингулярность случайных свойств поверхности объектов исследования порождают трудности учета или исключения влияния отдельных факторов, которые прямо или косвенно ведут к искажениям изображения структур поверхности в реальном времени, получаемых в AFM. Это и определяет интерес к использованию программных средств и разработки алгоритмов апостериорной обработки данных измерения для улучшения точности изображения биообъектов, получаемого в зондовых микроскопах.

Цель работы – исследование возможности создания алгоритма компенсации искажающего воздействия среды на изображение, основанного на процедуре апостериорной обработки данных измерения, с использованием базовых положений теории фильтрации, где искажающим фактором служит среда зазора «игла – биоповерхность», случайно изменяющегося во времени.

Методы исследования. Основные положения

Методы исследования, представленные в данной статье, основаны на фундаментальных положениях теорий вероятности, случайных процессов, математической статистики, теории фильтрации и обработки изображений. В разрабатываемой модели системы зондовой микроскопии учитывается, что формирование сигнала изображения происходит в цепи «игла – среда зазора – биоповерхность». Искажающее действие среды, которая случайным образом заполняет зазор «игла – био-

поверхность», описывается сверткой исходного неискаженного сигнала изображения с импульсной характеристикой среды:

$$f(x, y) = \varphi(x, y) \times h(x, y) = \iint \varphi(x, y) h(x - \eta, y - \nu) d\eta d\nu, \quad (1)$$

где $f(x, y)$ – искаженное средой промежутка изображение; $\varphi(x, y)$ – исходное неискаженное изображение; $h(x, y)$ – импульсная характеристика искажающего зазора «игла – биоповерхность»; \times – знак операции «свертка»; \iint – двойной интеграл в пределах $[-\infty; +\infty]$; η и ν – сдвиг (искажение) координат x и y .

Формально существующую компоненту аддитивного шума в цепи формирования сигнала изображения мы в данном исследовании не учитываем по двум причинам: во-первых, она легко устраняется специальными методами, зависящими от конкретного типа источника шумового воздействия; во-вторых, чтобы не усложнять математическое описание алгоритма компенсации влияния среды зазора «игла – биоповерхность» на сигнал изображения.

Применительно к изображению импульсную характеристику элемента цепи передачи изображения принято считать функцией рассеяния точки (ФРТ). Для зазора «игла – биоповерхность», заполненного средой, ФРТ обычно получают из совокупности данных теоретических расчетов и статистических моделей, основанных на долговременных наблюдениях, а также путем прямых, непосредственных измерений, проводимых в процессе формирования сигнала изображения поверхности исследуемого объекта [1], [3]-[7].

В динамике движения иглы над неравномерностями рельефа поверхности биообъекта зазор «игла – биоповерхность» не остается постоянным, как это считается во многих моделях. Размер зазора, следовательно, и толщина слоя среды, которая его заполняет, меняются случайным образом в соответствии с изменением рельефа биоповерхности. Случайное изменение рассеивающих свойств слоя среды, заполняющей зазор «игла – биоповерхность» в реальном времени, вносит случайные искажения в формирование сигнала изображения AFM. Эти динамически случайные искажения пространственно распределены.

Учитывая предельно малые размеры иглы зонда и противолежащего элемента поверхности, разделенных зазором «игла – биоповерхность», можно принять центр иглы несмещенным относительно центра противолежащего элемента. Тогда ФРТ полностью занимает этот элемент XU декартовой плоскости наблюдения. Заметим, что в общем случае ФРТ пространства зазора «игла – поверхность» несимметрична в плоскости перпендикулярного сечения.

С учетом принятого нами предположения отсутствия шума коррекция сигнала изображения AFM сводится к нахождению импульсной характеристики системы восстановления сигнала, являющейся обратной по отношению к импульсной характеристике системы, вызвавшей его искажения [15]. Условие точного восстановления сигнала изображения в AFM соответствует выполнению следующего равенства:

$$h(x, y) \times h'(x, y) = \delta(x, y), \quad (2)$$

где $h'(x, y)$ – импульсная характеристика системы восстановления сигнала изображения; $\delta(x, y) = 1(x, y)$ – единичная функция. На практике, из-за влияния многих факторов, идеальное получение равенства $\delta(x, y) = 1(x, y)$ затруднено. Гораздо чаще получим $\delta^*(x, y) \approx 1$, где $\delta^*(x, y)$ – некоторое приближение результата к идеальному решению $\delta(x, y) = \delta^*(x, y)$.

Уравнение (1), учитывающее искажающее действие зазора «игла – биоповерхность» в линейной модели цепи формирования сигнала изображения зондового микроскопа, в операторном представлении принимает вид

$$f = H \cdot \varphi, \quad (3)$$

где H – линейный интегральный оператор цепи формирования изображения.

Если предположить, что существует оператор B , обратный по отношению к линейному оператору цепи формирования изображения H , такой, что

$$B = H^{-1}, \quad (4)$$

то, следуя уравнению (4), получим из уравнения (3) операторное уравнение следующего вида:

$$B \cdot f = \varphi. \quad (5)$$

Операторное уравнение (5) следует понимать как уравнение относительно неизвестной функции f при известных параметрах оператора восстановления сигнала изображения B и функции φ . При заданных начальных условиях $f|_{(0,0)} = f_0$ операторное уравнение (5) должно иметь единственное решение. Оператор восстановления сигнала B своими параметрами полностью характеризует линейную систему формирования неискаженного изображения из искаженного в цепи зазора «игла – биоповерхность» [3].

Результаты

Таким образом, операторные уравнения (3)-(5) позволяют по известным входу и выходу линейной зондовой системы определять параметры искажающего воздействия и восстанавливать сигналы изображения с разной степенью искажений относительно выбранного эталона. Алгоритм восстановления, описываемый уравнениями (3)-(5), апробирован на практике осуществлением коррекции линейной моды фазовых искажений волнового фронта лазерного пучка в системе с обратной связью [5]. Приведенное в работе [5] экспериментальное апробирование действия алгоритма в реальном времени по эталону осцилляций иглы зонда и фазовых искажений лазерной волны показывает высокую эффективность компенсации искажений линейной моды.

Коррекция искажающего действия среды, динамически заполняющей зазор «игла – биоповерхность», даже в линейной цепи формирования сигнала зондового микроскопа имеет существенные отличия от идеальной передачи. Отсутствие эталона и случайность параметров поверхностей биообъектов приводят к тому, что условие (2) точного восстановления сигнала в AFM становится трудновыполнимым. В отсутствие эталона условие восстановления сигнала изображения (2) превращается в неравенство:

$$h(x, y) \times h'(x, y) = \delta(x, y) < 1(x, y).$$

В этом случае, при заданной импульсной характеристике искажающей среды как фильтра, коэффициенты фильтра γ_{rs} находят решением уравнения идентификации

$$B h(x, y) = \delta(x, y). \quad (6)$$

В дискретном представлении h_{ij} и δ_{ij} определяются на равномерном квадратном $M \times M$ формате разбиения элемента изображения $i = -M \dots 0 \dots M$; $j = -M \dots 0 \dots M$; $\delta_{ij} = [1, i = j = 0; 0$ в остальных случаях, когда $i \neq j \neq 0, i = j \neq 0$ и т. д.]. При заданном начальном условии $h(x_0, y_0) = h_0$ уравнение (6) имеет единственное решение.

Применив к дискретному представлению уравнения идентификации (6) двумерное z -преобразование, получим

$$B(z_1, z_2)H(z_1, z_2) = 1.$$

Отсюда находим передаточную характеристику искажающего воздействия

$$H(z_1, z_2) = 1 / B(z_1, z_2). \quad (7)$$

Применяя преобразования (1)-(6) к уравнению (7), получим выражение импульсной характеристики искажающей среды вида рекурсивного фильтра

$$h_{ij} = \delta_{ij} - \sum \gamma_{rs} h_{i-r, j-s} \text{ для } (r, s) \neq (0, 0), \quad (8)$$

а условие восстановления изображения – вида нерекурсивного фильтра

$$\delta_{ij} = \sum \gamma_{rs} h_{i-r, j-s}.$$

Для определения коэффициентов γ_{rs} следует минимизировать сумму

$$\sum[\delta_{ij} - \sum \gamma_{rs} h_{i-r, j-s}]^2 > \min(\gamma_{rs}). \quad (9)$$

Применяя метод наименьших квадратов, получим систему линейных уравнений, из решения которой найдем требуемые коэффициенты фильтра γ_{rs} .

Для минимизации погрешности решения уравнения (6) импульсная характеристика искажающего слоя среды $h_{i,j}$ должна содержать в выражении (9) как можно большее число дискретных отсчетов. В идеале их число должно быть бесконечным. Реально достаточно того, чтобы импульсная характеристика, заданная дискретными отсчетами, соответствовала $\sim 0,9$ от желаемой [15].

Выбор порядка уравнения оператора коррекции в уравнениях (4), (5) основан на следующем. Во-первых, желателен учет априорной информации о характере искажающего действия среды. Например, импульсная характеристика рассеивающей среды зазора «игла – биоповерхность» как элемента цепи формирования сигнала изображения может быть представлена [14] экспонентой с показателем первой степени $h \sim \exp(-x)$. Тогда это – линейный оператор. Во-вторых, если нужно повысить точность решения уравнения (6), то следует выполнить итерацию по увеличению порядка уравнения оператора.

Подводя итог проделанной работе, отметим следующее.

Первый момент: искажение изображения, вносимое средой «игла – биоповерхность» из-за запаздывания формирования и передачи сигнала изображения, характеризуется откликом бесконечной длины. Мы описываем его посредством рекурсивного фильтра с бесконечной импульсной характеристикой. При этом синхронность процессов искажения и коррекции с достаточной точностью описывает выражение (8).

Второй момент: на искажения изображения средой зазора «игла – поверхность» мы не можем повлиять, так как зазор является элементом цепи формирования сигнала изображения. С точки зрения устойчивости рекурсивной фильтрации, можно предположить, что устойчивому процессу коррекции искажений соответствует устойчивый рекурсивный фильтр.

Точность апостериорной коррекции изображения, искаженного действием среды зазора «игла – поверхность», можно оценить количественно. Проведя некоторые математические преобразования, получим величину ϵ среднеквадратической ошибки (СКО) коррекции изображения вида

$$\epsilon^2 = [\sum(\delta'_{ij} - \delta_{ij})^2] / (2M + 1 - 2p)^2,$$

где δ'_{ij} – оценка импульсной переходной характеристики рассеивающей среды зазора «игла – поверхность»; δ_{ij} – импульс-

ная характеристика искажающей среды как рекурсивного фильтра; Σ – суммирование невязки $(\delta'_{ij} - \delta_{ij})$ по всем ij ; p – порядок оператора восстановления. Изменение этой среднеквадратической ошибки (СКО), нормированной на $\Sigma(\delta'_{ij} - \delta_{ij})^2$, показано на рис. 1.

Отметим принципиальную особенность алгоритма апостериорной обработки изображения биообъектов в зондовой микроскопии. Синхронное действие молекулярных и межатомных сил в зазоре «игла – биоповерхность» на вязкоупругую поверхность биологического объекта может влиять на структуру и форму изучаемой поверхности [1], [5]. Известные алгоритмы апостериорной обработки изображения биообъектов в зондовой микроскопии не учитывают деформацию поверхности в зазоре в динамике движения.

Потому учет случайной и вероятностной деформации исследуемой биоповерхности необходим для повышения точности зондовой системы.

Заключение

Исследована возможность апостериорного восстановления характеристик изображения биоповерхности путем коррекции искажающего действия среды, заполняющей зазор «игла – биоповерхность» в АФМ. Основой коррекции служит измеренный сигнал 3D-изображения АФМ. При интерпретации сигнала изображения учтены аспекты образования сигнала и искажающее действие среды в зазоре «игла – биоповерхность», имеющее вероятностную природу. Результаты применимы в атомно-силовой, емкостной и другой зондовой (АФМ, ТЕМ, SEM, АЕМ) микроскопии для численных оценок и улучшения качества изображения молекулярных биологических структур.

Список литературы:

1. *Cai J.* Atomic Force Microscopy in Molecular and Cell Biology. – Singapore: Springer Singapore, 2018.
2. *Tereshchenko S.A., Lysenko A. Y.* Investigation of the scattering influence on the quality of image reconstruction in single-photon emission computed tomography in a proportional scattering medium // Biomedical Engineering. 2020. Vol. 53. PP. 370-374.
3. *Deeva V.S., Slobodyan S.M.* Mathematical modeling of the interaction between a single-walled nanotube tip and a biological surface // Biomedical Engineering. 2020. Vol. 54. PP. 51-55.
4. *Shcherbina K.K., Golovin M.A., Suslyayev V.G., Marusin N.V., Yankovski V., Zolotukhina M.* An electronic geometric model for 3D scanning of human body segments and its use in prosthetics and orthotics. Causes of defects and methods for their elimination // Biomedical Engineering. 2020. Vol. 54. PP. 130-134.

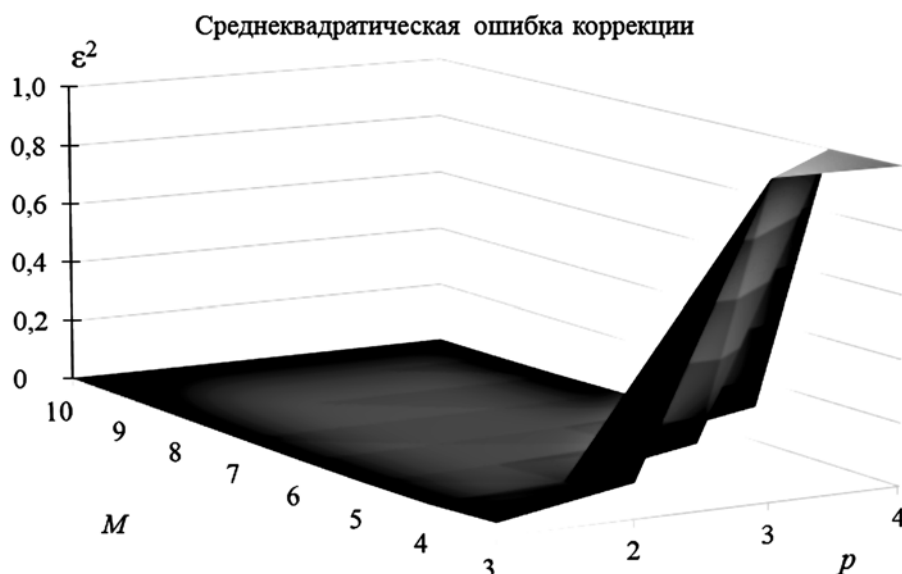


Рис. 1. Изменение нормированной среднеквадратической ошибки коррекции в зависимости от формата разбиения элемента изображения M и порядка уравнения оператора восстановления p

5. *Deeva V., Slobodyan S.* Mathematical model of tip oscillations: Influence on image quality // *Applied Surface Science*. 2020. Vol. 516. P. 146144.
6. *Schwille P.* There and back again: From the origin of life to single molecules // *European Biophysics Journal*. 2018. Vol. 47. PP. 493-498.
7. *Ozer H.O.* Atomic resolution force imaging through the static deflection of the cantilever in simultaneous scanning tunneling/atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2019. Vol. 196. PP. 54-57.
8. *Shestakova V.G., Vetrov A.N., Dmitriev G.A.* Assessment of skin wound healing by digital image analysis // *Biomedical Engineering*. 2020. Vol. 53. PP. 402-406.
9. *Cho Y., Shin N., Kim D., Park J., Hong S.* Nanoscale hybrid systems based on cnt for biological sensing and control // *Bioscience Reports*. 2017. Vol. 37. PP. 3-30.
10. *Zhang B., Liu Y., Chen Q., Lai Z., Sheng P.* Observation of high T_c one dimensional super conductivity in 4 angstrom carbon nanotube arrays // *AIP Advances*. 2017. Vol. 7. P. 025305.
11. *Heath G.R., Scheuring S.* High-speed AFM height spectroscopy reveals μ s-dynamics of unlabeled biomolecules // *Nature Commun*. 2018. Vol. 9. PP. 1-11.
12. *Caplins B., Holm J.D., Keller R.* Transmission imaging with a programmable detector in a scanning electron microscope // *Ultramicroscopy*. 2019. Vol. 196. PP. 40-48.
13. *Wagner T.* Steady-state and transient behavior in dynamic atomic force microscopy // *Journal of Applied Physics*. 2019. Vol. 125. P. 044301.
14. *Burke P.J.* An RF circuit model for carbon nanotubes // *IEEE Transaction of Nanotechnology*. 2003. Vol. 2. PP. 55-58.
15. *Gonzalez R., Woods R.* *Digital Image Processing*. – Pearson, 2018. 1192 p.

Вера Степановна Деева,
канд. техн. наук, доцент,
школа инженерного предпринимательства,
ФГАОУ ВО «Томский
политехнический университет»,
г. Томск,
Степан Михайлович Слободян,
д-р техн. наук, профессор,
кафедра материаловедения,
ФГБОУ ВО «Тверской
государственный технический университет»,
г. Тверь,
e-mail: sms_46@ngs.ru

А.И. Ахметова, В.М. Гукасов, Ю.Л. Рыбаков, И.В. Яминский

Быстродействующая сканирующая зондовая микроскопия в биомедицине

Аннотация

Статья посвящена сканирующей зондовой микроскопии и ее эффективному применению в медицинских целях. Приведены обзор возможностей и перспективы использования полученных при помощи зондовой микроскопии результатов в биомедицине. Описаны принципы измерений и преимущества по сравнению с другими методами диагностики, такими как оптическая микроскопия высокого разрешения и электронная микроскопия.

Введение

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) – это мощная многофункциональная исследовательская платформа, которая позволяет визуализировать биологические объекты и манипулировать ими [1]. У СЗМ имеется широкий арсенал наблюдаемых объектов – от отдельных молекул до живых клеток и тканей. Вскоре после изобретения прибора стало понятно, что для улучшения возможностей визуализации в биологии потребуются новые технологические разработки для устранения определенных ограничений метода. Это привело к созданию различных режимов визуализации, которые продолжают расширять возможности этой техники сегодня. Для биологических систем СЗМ дает много полезной информации, которую невозможно получить другими методами. Помимо получения данных о морфологии поверхности, при помощи СЗМ исследуют механические свойства биологических систем. Это важно, потому что соответствующие клеточные функции зависят от их механических свойств. Исследование вязкоупругости неопухолевых клеток и тканей молочной железы показало, что они менее деформируемы по сравнению с раковыми клетками и злокачественными тканями молочной железы [2]– [3]. Таким образом, большие клеточные системы демонстрируют измененные механические свойства.

Цель нашей работы – это практическое внедрение инструментальных методов сканирующей зондовой микроскопии в медицинскую технику для визуализации с высоким пространственным разрешением и исследования структуры, механических,

электрофизических и электрохимических свойств биологических объектов – вирусов, бактерий, клеток высших организмов – и определение реакции биообъектов на внешние воздействия.

Материалы и методы

В объединенной лаборатории бионаноскопии (физический и химический факультеты МГУ имени М.В. Ломоносова и Центр перспективных технологий) при помощи зондовой микроскопии реализуются исследования биополимеров, их морфологии и конформации, проводятся эксперименты по определению антибиотикорезистентности бактерий, а также по раннему обнаружению биологических агентов (вирусов и бактерий) и т. д. Другими перспективными направлениями в зондовой микроскопии являются адресная доставка биомолекул, 3D-биопечать и создание молекулярного принтера, что имеет большой потенциал для применения в медицинских целях. При помощи зондовой микроскопии возможна визуализация биологических объектов в естественных средах в движении с высокой разрешающей способностью без нарушения их функций. СЗМ позволяет получать информацию о функционировании клеточных систем, а также измерять последствия воздействия на клетки от применения реагентов, лекарств, при механических повреждениях.

Уникальной способностью СЗМ является визуализация структуры поверхности с высоким разрешением, вплоть до атомного масштаба. Эта способность прибора постоянно совершенствуется, и новые инструментальные методы помога-